

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	ターマコード* (参考)
A 6 1 K 48/00		A 6 1 K 48/00	
31/7088		31/7088	
47/36		47/36	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 35 頁)			
(21)出願番号	特願平10-513388	(71)出願人	パウダージェクト リサーチ リミテッド イギリス国 オーエックス4 4ジーエイ オックスフォード, ジ オックスフォー ド サイエンス パーク, ロバート ロビ ンソン アベニュー 4
(86) (22)出願日	平成9年9月11日(1997.9.11)	(72)発明者	バーコス, テリー リー アメリカ合衆国 カリフォルニア 94303, パロ アルト, トレヤ コート 711
(85)翻訳文提出日	平成11年3月10日(1999.3.10)	(72)発明者	マドル, アンドリュウ ゴードン イギリス国 シービー6 1エイエヌ ケ ンブリッジシャー, エリー, ウェスト フ ェン ロード 78
(86)国際出願番号	P C T / G B 9 7 / 0 2 4 7 8	(74)代理人	弁理士 山本 秀策
(87)国際公開番号	W O 9 8 / 1 0 7 5 0	最終頁に続く	
(87)国際公開日	平成10年3月19日(1998.3.19)		
(31)優先権主張番号	9 6 1 9 0 0 2 . 0		
(32)優先日	平成8年9月11日(1996.9.11)		
(33)優先権主張国	イギリス (G B)		

(54)【発明の名称】 核酸粒子の送達

(57)【要約】  
金属キャリアなしで、皮膚または粘膜組織への針を用い  
ない注入に適切である、核酸分子を含む粒子。

## 【特許請求の範囲】

1. 治療に用いるための、核酸分子を含み、金属キャリアを含まない、粒子。
2. 治療に用いるための、核酸分子からなる、またはその重量が核酸分子を主に含む、粒子。
3. 平均サイズが、皮膚または粘膜組織中の標的細胞のサイズと少なくとも同じ大きさである、請求項1または2に記載の粒子。
4. 平均サイズが $10\sim 250\mu\text{m}$ である、請求項1～3のいずれかに記載の粒子。
5. キャリアを含む、請求項1～4のいずれかに記載の粒子。
6. 前記キャリアがトレハロースを含む、請求項5に記載の粒子。
7. 前記核酸分子が、免疫原をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項1～6のいずれかに記載の粒子。
8. 皮膚または粘膜組織への針を用いない投与による治療に用いるための、金属キャリアを含まない医薬の製造のための、核酸分子を含む粒子の使用。
9. 前記粒子が、請求項2～7のいずれかに規定される、請求項8に記載の使用。
10. 前記核酸分子が、標的細胞ゲノムから欠損または欠失しているタンパク質をコードする遺伝子を含む、請求項8または9に記載の使用。
11. 送達されるべき活性成分として、請求項1～7のいずれかで規定される粒子を含む、針のないシリンジ。
12.  $2\sim 10\text{kg/秒/m}$ の間の運動量密度で粒子を送達するように適合された、請求項11に記載の針のないシリンジ。
13. 皮膚または粘膜組織中の標的細胞に、核酸分子を含む粒子を送達する方法であって、該粒子が、針のないシリンジによって該皮膚または粘膜組織に投与され、かつ金属キャリアを含まない、方法。
14. 前記粒子が、前記標的細胞のサイズと等しいか、またはそれより大きい平均サイズを有する、請求項13に記載の方法。
15. 前記粒子が、主に約 $10\sim 250\mu\text{m}$ の範囲にある平均サイズを有する、請求項13に記載の方法。
16. 前記粒子が、 $2\sim 10\text{kg/秒/m}$ の間の運動量密度で、前記皮膚または粘膜組

織粒子に投与される、請求項13～15のいずれかに記載の方法。

17. 前記粒子が、表皮組織中の標的細胞に送達される、請求項13～16のいずれかに記載の方法。

18. 前記粒子が、皮膚組織の基底層中の標的細胞に送達される、請求項13～16のいずれかに記載の方法。

19. 前記粒子が、核酸分子およびキャリア材料を含む、請求項13～18に記載の方法。

20. 前記キャリア材料がトレハロースを含む、請求項19に記載の方法。

21. 前記粒子が、インビボで前記皮膚または粘膜組織に送達される、請求項13～20のいずれかに記載の方法。

22. 前記粒子が、エキスビボで前記皮膚または粘膜組織に送達される、請求項13～20のいずれかに記載の方法。

23. 前記核酸分子が、前記標的細胞ゲノムから欠損または欠失しているタンパク質をコードする遺伝子を含む、請求項13～22のいずれかに記載の方法。

24. 前記核酸分子が、免疫原をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項13～22のいずれか1項に記載の方法。

25. 針のないシリンジによる皮膚または粘膜組織への投与に適切な粒子状核酸組成物であって、該組成物は金属キャリアを含まない、組成物。

**【発明の詳細な説明】****核酸粒子の送達**技術分野

本発明は一般的にDNA送達方法に関する。より具体的には、本発明は、針を用いない注入技術を使用する、哺乳動物組織への粉末化された核酸分子のインビボおよびエキソビボ送達に関する。

発明の背景

遺伝子治療およびDNA免疫は、後天性疾患および遺伝疾患の両方を処置および予防するための有望なアプローチである。これらの技術は、所望の遺伝子を被験体に移入し、その後その遺伝子をインビボ発現させることを提供する。遺伝子移入は、被験体の細胞または組織をエキソビボでトランスフェクトし、そしてその形質転換物質を宿主に再導入することによって達成され得る。あるいは、遺伝子は、レシピエントに直接投与され得る。

これらの状況下で遺伝子送達のための多くの方法が開発されてきた。例として、例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルスベクターを使用するウイルスベース系が、遺伝子送達のために開発されてきた。しかし、これらの系は、複製能力を有するウイルスを送達する危険を引き起こす。したがって、レシピエント細胞および組織に遺伝子を直接移入するための非ウイルス性の方法が望ましい。

遺伝子移入の非ウイルス性の方法は、しばしば、巨大分子の取り込みおよび細胞内輸送のために哺乳動物細胞によって用いられる機構に頼る。例えば、遺伝子移入のレセプター媒介方法が開発された。この技術は、プラスミドDNAと、細胞表面レセプターによって認識され得るポリペプチドリガンドとの間の複合体を利用する。しかし、データは、この方法が、遺伝子の一過性発現のみを可能にし得、したがって限定された適用のみを有することを示唆する。

さらに、細胞に遺伝物質を直接注入するためのマイクロインジェクション技術が開発された。しかし、この技術は困難であり、そして単細胞の操作を必要とする。したがって、この方法は、大規模に使用するには不適切である。

その後の細胞による取り込みのための、間隙空間へのDNA含有溶液の直接注入もまた、記載されている。例えば、国際公開第WO 90/11092号(1990年10月4日公開)は、細胞内部への単離ポリヌクレオチドの送達を記載する。ここで、単離ポリヌクレオチドは、組織の間隙空間に送達され、次いで個々の細胞によって取り込まれて治療効果を提供する。このような方法は、従来の針またはカニューレを使用して組織中へDNA含有溶液を注入すること必要とし、したがって長期間の治療にも屋外もしくは家庭での適用にも十分には適さない。

微粒子銃粒子送達系(biolistic particle delivery system)(粒子衝撃送達系; particle bombardment system)もまた、植物細胞への遺伝子送達のために開発されてきた。このような技術は、細胞中にDNAコートされた微粒子(例えば、DNAコートされた金属)を高速で導入するための「遺伝子銃」を使用する。コートされた金属は、一般に、不活性ガス(例えば、ヘリウム)の爆発的破裂を用いて細胞中に押し込まれる。例えば、Sanfordらへの米国特許第5,100,792号を参照。この技術は、少量のDNAの直接的な細胞内送達を可能にする。

タングステンまたは金粒子微小発射体(microprojectile)は、一般に、このような直接注入技術により妥当な遺伝子移入頻度を達成するために必要とされる。特に、これらの物質は、直径約1  $\mu$ mという規定された粒子サイズでの入手可能性、および細胞壁貫通に必要な運動量を達成するに十分な高密度を有することに基づいて選択されてきた。さらに、使用される金属は、微細な微小発射体粉末の爆発的酸化の可能性を減少させるために化学的に不活性であり、DNAおよび沈澱化混合物(precipitating mix)中の他の成分と非反応性であり、そして標的細胞に対して低い毒性を示す。例えば、Particle Bombardment Technology for Gene Transfer (1994) Yang, N.編、Oxford University Press、New York、NY、10頁～11頁を参照。

しかし、タングステンの毒性は、安定な形質転換体の回収を減少させ得るという証拠が存在する。さらに、このような微粒子銃技術は、大きなDNA分子を用いて使用することに適切でない。なぜなら、金属キャリア上へのこのような分子の析出は、遺伝子銃送達の剪断応力に持ちこたえない不安定な形状を導き得るから

である。さらに、金属キャリアは、組織および/または細胞によって保持され、そして特に、内部組織への直接送達またはエキソビボ技術を使用する細胞の直接処理の場合に、変色および他の多くの望ましくない生物学的効果を引き起こし得る。したがって、DNAコートした金属粒子を送達するための遺伝子銃の使用は、特に、哺乳動物被験体において、反復治療に関して問題が多いようである。

したがって、以前の遺伝子送達技術で一般的に遭遇する問題を回避する、治療的に関連するDNAまたは他の核酸分子を哺乳動物組織細胞に導入するために高度に効率的な方法を提供する必要性が残る。

#### 発明の開示

本発明は、少なくとも約 $10\mu\text{m}$ の名目平均直径を有し、したがって平均的な哺乳動物細胞より大きな核酸分子の固体粒子が、高度に効率的な遺伝子移入のために、哺乳動物組織の細胞中に送達され得るという驚くべき発見に基づく。今日まで、代表的な哺乳動物細胞よりずっと小さなサイズを有する小さな、DNAコートされた金属性粒子のみが、微粒子銃遺伝子送達技術において微小発射体として適切に使用され得ると信じられていたので、この結果は予想外である。例えば、Particle Bombardment Technology for Gene Transfer (1994) Yang, N.編、Oxford University Press、New York、NY、10頁～11頁を参照。

本発明の実施において、粉末化された核酸分子は、針を用いない注入技術を使用して送達される。詳細には、インタクトな皮膚中におよびこれを経て、治療薬剤の固体粒子を、制御された用量で発射するために針のないシリンジを使用する新規な送達系は、本出願人に譲渡された国際公開第WO 94/24263号(1994年10月27日公開)に最近記載された。この公開公報は、超音波ガスフローに搬送された薬学的粒子を送達する針のないシリンジを記載する。針のないシリンジは、粉末化された薬物化合物および組成物の経皮送達のため、生存細胞への遺伝物質の送達(例えば、遺伝子治療)のため、および皮膚、筋肉、血液、またはリンパへの生物薬剤の送達のために使用され得る。針のないシリンジはまた、薬物および生物製剤を器官表面、固体腫瘍および/または外科手術腔(surgical cavity; 例えば、

腫瘍床または腫瘍切除後の腔)に送達するために外科手術と共に使用され得る。

したがって、1つの実施態様において、本発明は、送達された核酸で組織中の細胞を遺伝的に形質転換するために、核酸分子から構成される固体粒子を、哺乳動物組織へ送達するための方法に関する。従来の粒子衝撃技術から実質的に逸脱して、本発明の方法を使用して移入される核酸粒子は、高密度の金属キャリアを使用して送達されない。さらに、この分子は、平均的な哺乳動物細胞サイズ以上の粒子サイズを有する。

より具体的には、選択された核酸分子および、必要に応じて、適切なキャリアまたは賦形剤から構成される高密度化された粒子が、マッハ1とマッハ8との間の超音波送達速度で粒子を発射し得る針のないシリンジを介する哺乳動物細胞への送達のために調製される。この粒子は、少なくとも約 $10\mu\text{m}$ である平均サイズを有する。ここで、最適な粒子サイズは、通常、少なくとも約 $10\sim 15\mu\text{m}$ (代表的な哺乳動物細胞のサイズ以上)である。しかし、 $250\mu\text{m}$ 以上の平均粒子サイズを有する核酸粒子もまた、本方法を使用して送達され得る。送達される粒子が標的化された組織を貫入する深度は、粒子サイズ(例えば、概ね球状の粒子の幾何学的形状を仮定する名目の粒子直径)、粒子密度、粒子が組織表面に衝突する初速度、ならびに組織の密度および動粘性率に依存する。この点に関して、針を用いない注入における使用に最適な個々の粒子密度は(例えば、バルクの粉末密度とは対照的に)、一般に、約 $0.1\text{g}/\text{cm}^3$ と $25\text{g}/\text{cm}^3$ との間の範囲であり、そして注入速度は、一般に、約 $200\text{m}/\text{秒}$ と $3,000\text{m}/\text{秒}$ との間の範囲である。

本発明の種々の局面において、上記方法は、核酸粒子の標的化された送達、例えば、表皮(遺伝子治療適用のため)または皮膚の基底層(核酸免疫適用のため)への送達を提供するためにインビボで実施され得る。本発明のこれらの局面において、粒子特性および/またはデバイス操作パラメータは、組織特異的送達を提供するように選択される。1つの特定のアプローチは、約 $2\text{kg}/\text{秒}/\text{m}$ と $10\text{kg}/\text{秒}/\text{m}$ との間、そしてより好ましくは約 $4\text{kg}/\text{秒}/\text{m}$ と $7\text{kg}/\text{秒}/\text{m}$ との間の運動量密度(例えば、粒子運動量/粒子正面面積)を提供するように、粒子サイズ、粒子密度、および初速度の選択を必要とする。運動量密度によるこのような制御は、核酸粒子の正確に制御された組織選択的な送達を可能にする。

本発明の他の局面において、針のないシリンジは、粒子状核酸分子を用いて細胞または組織をエキソピボでトランスフェクトするために使用される。ここで、形質転換細胞は、続いて宿主に再導入される。

本発明のこれらの実施態様および他の実施態様は、本明細書中の開示を考慮すれば、当業者に容易に想起される。

#### 図面の簡単な説明

図1は、本明細書に記載された粒子状核酸調製物で形質転換されるべき細胞を含む組織培養プレートの上方に配置された、針のないシリンジを備えたエキソピボ送達装置の図面である。

図2は、実施例に記載されたように、図1の装置を使用して60mmの標的距離にわたって30バール圧でDNA粒子を送達して得られた形質転換効率を示す棒グラフである。

図3は、これもまた実施例に記載されたように、図1の装置を使用して所定の範囲の標的距離にわたって30バール圧でDNA粒子を送達して得られた形質転換効率を示すグラフである。

#### 好ましい実施態様の詳細な説明

本発明の実施は、他に示されない限り、分子生物学の従来の方法、および当該技術分野内の組換えDNA技術を用いる。そのような技術は、文献において十分に説明されている。例えば、Sambrookら、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 1 (第2版、1989) ; Maniatisら、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982) ; DNA Cloning: A Practical Approach, 第1巻および第2巻 (D. Glover編) ; Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*を参照のこと。

本明細書および添付の請求の範囲において使用されるように、単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈がそうでないことを明白に記載しない限り、複数の言及を含むことは注意されなければならない。従って、例えば、「核酸分子」との言及は、2つ以上の核酸分子の混合物を含み、「賦形剤」との言及は、2つ以上の賦形剤の混合物を含むなど。

#### A. 定義



他に定義されない限り、本明細書中で使用されるすべての技術的および科学的用語は、本発明が関係する当業者によって通常理解されるのと同じ意味を有する。以下の用語は、以下で示されるように定義されると意図される。

「遺伝子送達」は、宿主細胞中に外来DNAを確実に挿入するための方法または系をいう。そのような方法は、非組込み移入DNAの発現、染色体外複製、および移入レプリコン（例えば、エピソーム）の発現、または宿主細胞のゲノムDNA中への移入された遺伝物質の組込みを生じ得る。

ヌクレオチド配列は、一般に適切な核酸分子中に存在し、そしてベクターの形態で送達される。「ベクター」によって、任意の遺伝子エレメント（例えば、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、染色体、ウイルス、ビリオンなど）が意味され、それは、適切な制御エレメントと結合される場合に複製し得、そしてそれは細胞間で遺伝子配列を移入し得る。

「ヌクレオチド配列」または「核酸分子」は、DNAおよびRNA配列をいう。用語捕獲分子は、以下のようなDNAおよびRNAの任意の公知の塩基アナログを含むが、それらに限定されない：4-アセチルシトシン、8-ヒドロキシ-N6-メチルアデノシン、アジリジニルシトシン、プソイドイソシトシン、5-（カルボキシヒドロキシルメチル）ウラシル、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルアデニン、1-メチルプソイド-ウラシル、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチル-グアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチル-シトシン、5-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシ-アミノメチル-2-チオウラシル、 $\beta$ -D-マンノシルキューオシン、5'-メトキシカルボニルメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、オキシブトキソシン（oxybutoxosine）、プソイドウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、N-ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエ

ステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、プソイドウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、および2,6-ジアミノプリン。

「コード配列」、または特定のポリペプチドを「コード」する配列は、適切な調節配列の制御下に置かれる場合、インビトロまたはインビボにおいてポリペプチドに転写（DNAの場合）および翻訳（mRNAの場合）される核酸配列である。コード配列の境界は、5'（アミノ）末端での開始コドン、および3'（カルボキシ）末端での翻訳終止コドンによって慣習的に決定される。コード配列は、原核生物mRNAまたは真核生物mRNA由来のcDNA、原核生物DNAまたは真核生物DNA由来のゲノムDNA配列、および合成DNA配列さえも含み得るが、それらに限定されない。転写終止配列は、通常コドン配列に対して3'に配置される。

用語DNA「制御配列」は、集合的に、プロモーター配列、ポリアデニル化シグナル、転写終止配列、上流調節ドメイン、複製起点、内部リボソーム侵入部位（internal ribosome entry site）（「IRES」）、エンハンサーなどをいい、これらは集合的にレシピエント細胞中のコード配列の複製、転写、および翻訳を提供する。選択される遺伝子が適切なレシピエント細胞において複製、転写、および翻訳され得る限りは、これらの制御配列のすべてがいつも存在する必要はない。

「作動可能に連結される」は、そのように記載される成分がそれらの通常の機能を実行するように配置される、エレメントの配置をいう。従って、コード配列に作動可能に連結された制御配列は、コード配列の発現を実現させ得る。制御配列は、それらがそれらの発現を指向するように機能する限りは、コード配列と隣接する必要はない。従って、例えば、翻訳されないが転写される介在性配列がプロモーター配列とコード配列との間に存在し得、そしてプロモーター配列はなおコード配列に「作動可能に連結された」と考えられ得る。

ヌクレオチド配列、またはヌクレオチド配列を含む核酸分子をいう場合、「単離された」によって、指示される分子が、同型の他の生物学的巨大分子の実質的に非存在下で存在することが意味される。従って、「特定のポリペプチドをコードする単離された核酸分子」は、対象のポリペプチドをコードしない他の核酸分子を実質的に含まない核酸分子をいう；しかし、この分子は、組成物の基本的特徴に悪影響を及ぼさないいくつかのさらなる塩基または部分を含み得る。

用語「トランスフェクション」は、宿主細胞による外来DNAの取り込みをいうために用いられ、そして宿主細胞は、トランスフェクトされた結果として「形質転換」されている。外来DNAは、細胞のゲノムを構成する染色体DNAに組み込み（共有結合）されても、またはされなくてもよい。「宿主細胞」または「宿主哺乳動物細胞」によって、目的のヌクレオチド配列を含む核酸分子によってトランスフェクトされたか、またはトランスフェクトされ得る細胞が意味される。この用語は、目的のヌクレオチド配列が細胞内に存在する限りは、子孫が形態学または遺伝子構成において起源の親と同一であろうとなかろうと親細胞の子孫を含む。

用語「経皮」送達は、経皮(transdermal)（または「経皮(percutaneous)」）および経粘膜投与の両方、すなわち皮膚または粘膜組織を通じる薬物または薬学的薬剤による送達を含む。例えば、Transdermal Drug Delivery: Developmental Issues and Research Initiatives, HadgraftおよびGuy（編）、Marcel Dekker, Inc., (1989); Controlled Drug Delivery: Fundamentals and Applications, RobinsonおよびLee（編）、Marcel Dekker Inc., (1987); ならびに Transdermal Delivery of Drugs, 第1～3巻、KydonieusおよびBerner（編）、CRC Press, (1987)を参照のこと。本明細書中で「経皮」送達の文脈において記載される本発明の局面は、他に特定されない限り、経皮および経粘膜の両方の送達に適用することが意味される。すなわち、本発明の組成物、系、および方法は、他に明白に記載されない限り、送達の経皮および経粘膜モードに等しく適用可能であることが推定されるべきである。

単独、または薬物もしくは他の治療剤と組み合わせた上記の核酸分子は、代表的には、一般に1つ以上の添加物質（例えば、キャリア、ビヒクル、および／または賦形剤）を含む粒子状組成物として調製される。通常、「キャリア」、「ビヒクル」、および「賦形剤」は、非毒性であり、そして有害な様式で組成物の他の成分と相互作用しない実質的に不活性な物質である。これらの物質は、粒子状薬学的組成物（例えば、さらに以下で記載されるようなスプレー乾燥または凍結乾燥技術を用いて調製される組成物）中の固体の量を増加させるために使用され得る。適切なキャリアの例は、シリコーン、ゼラチン、ワックス、および類似の物質を含む。通常使用される「賦形剤」または「キャリア」の例は、薬学的グレ

ードのブドウ糖、スクロース、ラクトース、トレハロース、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、デキストラン、デンプン、セルロース、リン酸ナトリウムまたはリン酸カルシウム、硫酸カルシウム、クエン酸または酒石酸（およびそれらの薬学的に受容可能な塩）グリシン、高分子量ポリエチレングリコール（PEG）、およびそれらの組み合わせを含む。安定剤として作用する例示的な賦形剤は、一般に入手可能な凍結保護物質および抗酸化剤を含む。

#### B. 本発明を実施する様式

本発明を詳細に記載する前に、本発明は、特定の処方物またはプロセスのパラメーターに（それらは当然のことながら変化し得る）限定されないことが理解されるべきである。本明細書中で使用される用語は、本明細書中の特定の実施態様を記載する目的のためのみであり、そして限定するように意図されないこともまた理解されるべきである。

本明細書中で記載されるものに類似または等価の多くの方法および材料が、本発明の実施において使用され得るが、好ましい材料および方法が本明細書中に記載される。

上記で説明されるように、本発明は、少なくとも約 $10\mu\text{m}$ という名目上の平均直径を有する核酸分子の固体粒子の、哺乳動物組織および細胞への非常に効率的な送達を可能にする。本方法は微粒子銃（biolistic）遺伝子移入技術を利用するが、金属キャリアの必要性なしに核酸分子の送達を可能にする。

広範な種々の核酸分子が、本発明の方法を用いて送達され得る。一般に、分子は、適切な制御配列または他の治療的に関連するヌクレオチド配列を有するコード配列を含む。核酸分子は、宿主細胞中で転写および翻訳を指向するに必要なエレメントを含むベクターの形態で調製される。宿主の酵素を用いる（例えば、内因性RNAポリメラーゼの使用によって）発現が所望される場合、遺伝子または複数の遺伝子は、特定の宿主、またはさらに宿主中の特定の細胞によって認識される制御配列に作動可能に連結されたベクター中に存在する。従って、真核生物制御エレメントおよびファージ制御エレメントは、哺乳動物宿主における発現のために存在する。そのような配列は、当該技術分野において公知であり、そして以

下でより十分に考察される。

本発明の送達方法における使用のための適切なヌクレオチド配列は、任意の治療的に関連するヌクレオチド配列を含む。従って、本発明は、標的細胞のゲノムから欠損または欠失しているタンパク質をコードする1つ以上の遺伝子、または所望の生物学的または治療的效果（例えば、抗ウイルス機能）を有する非天然タンパク質をコードする1つ以上の遺伝子を送達するために使用され得る。本発明はまた、免疫を提供し得るヌクレオチド配列（例えば、被験体における体液性応答および／または細胞性応答を誘発することに役立つ免疫原性配列）、またはアンチセンスもしくはリボザイム機能を有する分子に対応する配列を送達するために使用され得る。バクテリオファージの表面上で発現されるランダムなペプチドを用いる1つのそのようなアッセイが、最近実施された。Wu, *Nature Biotechnology* 14:429-431。このような例において、ファージの表面上において巨大な配列のペプチドを呈するファージ提示ライブラリーが生成された。次いでこのライブラリーのファージはマウス中に注射され、次いで種々の器官に結合するペプチドを発現するファージが同定された。次いで、器官に結合したファージに含まれるDNAは、各器官中の細胞の表面と相互作用し得るペプチドモチーフを同定するために配列決定された。当業者は、そのようなランダムなペプチドライブラリーを、本発明TR1レセプターの表面に結合するモチーフについてスクリーニングし得ることを認識する。そのようなモチーフを同定した後、次いでこれらのペプチドを、本明細書中に記載するアッセイを用いて、アゴニストまたはアンタゴニスト活性についてスクリーニングし得る。

送達され得る適切な遺伝子としては、炎症疾患、自己免疫疾患、慢性疾患およびAIDSのような障害を含む感染性疾患、ガン、神経性疾患、心血管性疾患、高塩素血症(hypercholesterolemia);種々の血液障害(種々の貧血、地中海貧血症、および血友病を含む);遺伝学的欠損（例えば、嚢胞性線維症、ゴーシェ病、アデノシンデアミナーゼ(ADA)欠損症、肺気腫）などを処置するために使用される遺伝子が挙げられる。ガンおよびウイルス疾患のアンチセンス治療に有用な多数のアンチセンスオリゴヌクレオチド（例えば、mRNAの翻訳の開始部位(AUGコドン)の周辺の配列に相補的な短いオリゴヌクレオチド）が、当該分野において記載され

ている。例えば、Hanら、(1991) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 88:4313;Uhlmannら、(1990) Chem.Rev. 90:543;Heleneら、(1990) Biochim.Biophys.Acta. 1049:99;Agarwalら、(1988) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:7079;およびHeikkiläら、(1987) Nature 328:445を参照のこと。本明細書中での使用に適した多数のリボザイムもまた記載されている。例えば、Cechら、(1992) J.Biol.Chem. 267:17479およびGoldbergら、米国特許第5,225,347号を参照のこと。

例えば、固形腫瘍の処置のための方法において、毒性ペプチド遺伝子（すなわち、リシン、ジフテリア毒素およびコブラ毒液因子のような化学療法剤）、p53のような腫瘍サプレッサー遺伝子、トランスフォーミングオンコジーンに対するアンチセンスであるmRNA配列をコードする遺伝子、抗腫瘍性ペプチド（例えば、肺瘍壊死因子(TNF)および他のサイトカイン）、またはトランスフォーミングオンコジーンのトランスドミナントネガティブ変異体が、腫瘍部位に、またはその付近に発現のために送達され得る。

同様に、抗ウイルス性および/または抗細菌性活性を示すか、または宿主免疫系を刺激することが知られるペプチドをコードする遺伝子もまた投与され得る。従って、インターロイキン、インターフェロン、およびコロニー刺激因子のような種々のサイトカイン（またはその機能的フラグメント）の多くをコードする遺伝子が本発明での使用を見出す。多数のこれらの物質の遺伝子配列が公知である。

遺伝的疾患の処置のために、特定の障害において欠損していることが知られている遺伝子に対応する機能的遺伝子が被験体に投与され得る。本方法はまた、アンチセンス治療（例えば、特定の相補的な配列にハイブリダイズし得、それによってこれらの配列の転写および/または翻訳を阻害し得るオリゴヌクレオチドの送達）において使用を見出す。従って、特定の疾患の進行に必要なタンパク質をコードするDNAまたはRNAが標的化され得、それによって疾患進行が破壊され得る。アンチセンス治療、および疾患原因遺伝子の発現を阻害または調整するために所定の核酸標的配列に特異的に、そして予想通りに結合し得る多数のオリゴヌクレオチドは当業者に公知であり、容易に利用可能である。Uhlmannら、(1990) Chem. Rev. 90:543, Neckersら、(1992) Crit.Rev.Oncogenesis 3:175;Simonsら

、(1992) Nature 359:67;Bayeverら、(1992) Antisense Res.Dev. 2:109;Whitese11

ら、(1992) Antisense Res.Dev. 1:343;Cookら、(1991) Anti-Cancer Drug Design 6:585;Eguchiら、(1991) Annu.Rev.Biochem. 60:631. 従って、宿主細胞中の標的配列に選択的に結合し得るアンチセンスオリゴヌクレオチドが、アンチセンス治療における使用のために本明細書中に提供される。

核酸免疫化のために、抗原をコードする発現ベクターが、ベクターによってコードされる抗原に対する体液性および/または細胞性免疫応答を誘発する目的のために被験体に送達され得る。特に、抗原をコードするDNAの直接的な筋肉内注射によって誘発される体液性免疫応答、細胞傷害の細胞性免疫応答および保護的免疫応答が記載されている。Tangら、(1992) Nature 358:152;Davisら、(1993) Hum.Molec.Genet. 2:1847;Ulmerら、(1993) Science 258:1745;Wangら、(1993) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:4156;Eisenbraunら、(1993) DNA Cell Biol. 12:791;Fynanら、(1993) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:12476;Fullerら、(1994) AIDS Res.Human Retrovir. 10:1433;およびRazら、(1994) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 91:9519。

本発明を実施するための様式は、以下により完全に記載される。

#### 遺伝子の単離およびベクターの構築：

本発明における使用のために選択されるヌクレオチド配列は、公知の供給源から、例えば、標準的な技術を用いて所望の遺伝子またはヌクレオチド配列を含む細胞から単離することによって、得られ得る。同様に、ヌクレオチド配列は、当該分野で周知である標準的な様式のポリヌクレオチド合成を用いて、合成的に生成され得る。例えば、Edgeら、(1981) Nature 292:756;Nambairら、(1984) Science 223:1299;Jayら、(1984) J.Biol.Chem. 259:6311を参照のこと。一般に、合成オリゴヌクレオチドは、Edgeら、(前出)およびDuckworthら、(1981) Nucleic Acids Res. 9:1691に記載されるようなホスホトリエステル法、またはBeaucageら、(1981) Tet.Letts. 22:1859、およびMatteucciら、(1981) J.Am.Chem.Soc. 103:3185に記載されるようなホスホルアミダイト法のいずれかによって調

製され得る。合成オリゴヌクレオチドはまた、市販の自動化オリゴヌクレオチド合成機を用いて調製され得る。従って、ヌクレオチド配列は、特定のアミノ酸配列に

関する適切なコドンを用いて設計され得る。一般に、意図される宿主での発現のために好ましいコドンが選択される。完全な配列が、標準的な方法によって調製されるオーバーラップするオリゴヌクレオチドから組み立てられ、そして完全なコード配列が構築される。例えば、Edgeら、(前出); Nambairら、(前出)およびJayら、(前出)を参照のこと。

本明細書中での使用のために核酸配列を得るための特に簡便な方法は、組換え手段による。従って、所望のヌクレオチド配列が、標準的な制限酵素及び手順を用いて、所望のヌクレオチドを保有するプラスミドから切り出され得る。当該分野において一般に理解され、そしてその詳細が市販の制限酵素の製造業者によって特定化されている条件下で、適切な制限酵素で処理することによって、部位特異的DNA切断が行われる。所望される場合、切断されたフラグメントのサイズ分離は、標準的な技術を用いるポリアクリルアミドゲルまたはアガロースゲル電気泳動によって行われ得る。

制限切断されたフラグメントは、標準的な技術を用いて、4つのデオキシヌクレオチド3リン酸(dNTP)の存在下でE.coli DNAポリメラーゼI (Klenow) のラージフラグメントで処理することによって平滑末端化され得る。Klenowフラグメントは、5'一本鎖突出部において充填するが、4つのdNTPが存在するにもかかわらず、突出する3'一本鎖を消化する。所望される場合、選択的な修復が、突出部の特性によって決められる限定内の1つのみ、またはいくつかの、選択されたdNTPを供給することによって行われ得る。Klenow処理の後、混合物は、例えば、フェノール/クロロホルムで抽出され、そしてエタノール沈殿され得る。S1ヌクレアーゼまたはBAL-31での適切な条件下での処理は、任意の一本鎖部分の加水分解を生じる。

一旦、所望のタンパク質のコード配列が調製または単離されると、そのような配列は、任意の適切なベクターまたはレプリコンにクローン化され得る。多数の



クローニングベクターが当業者に公知であり、そして適切なクローニングベクターの選択は、随意に行われる。他の配列への連結は、当該分野で公知の標準的な手順を用いて行われる。

選択されたヌクレオチド配列は、調節配列（例えば、プロモーター、リボソ-

ム結合部位および、必要に応じて、オペレーター（本明細書中では「制御」エレメントと総称的に呼ばれる）の制御下に置かれ得、その結果、所望のタンパク質をコードする配列は、この発現構築物を含むベクターによって形質転換された宿主組織においてRNAに転写される。コード配列は、シグナルペプチドまたはリーダー配列を含んでも良いし、含まなくてもよい。

制御エレメントの選択は、形質転換される宿主および使用される調製の型に依存する。従って、宿主の内因性の転写機構および翻訳機構が、タンパク質を発現するために使用される場合、特定の宿主と適合性である制御エレメントが利用される。この点に関して、哺乳動物系で使用するための数種のプロモーターが当該分野で公知であり、そしてとりわけSV40、CMV、HSV、RSV、MMTV、T7、T3に由来するプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。同様に、原核生物の酵素とともに使用するのに有用なプロモーターが公知であり、tac、spa、trp、trp-lac  $\lambda$ -P<sub>L</sub>、T7、phoAプロモーターなどが挙げられる。

制御配列に加えて、送達されたヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質配列の発現の調節を可能にする調節配列を付加することが所望され得る。調節配列は当業者に公知であり、そして例としては、化学的または物理的刺激（調節化合物の存在を含む）に応答してコード配列の発現をオンまたはオフにする調節配列が挙げられる。調節エレメントの他の型もまた、ベクター中に存在し得る（例えば、エンハンサー配列）。

制御配列に関してコード配列の位置および方向が、制御配列の「制御」下でのコード配列の転写を可能にする（すなわち、制御配列でDNA分子に結合するRNAポリメラーゼは、コード配列を転写する）ように、特定のコード配列が、適切な制御配列（および必要に応じて、調節配列）とともにベクター内に配置されるように、発現ベクターは構築される。目的の特定のタンパク質をコードする配列の改

変は、この目的を達成するために所望され得る。例えば、いくつかの場合において、配列が適切な方向で制御配列に付着されるように（すなわち、リーディングフレームを維持するために）、配列を改変することが必要であり得る。制御配列および他の調節配列は、ベクタへの挿入の前にコード配列に連結され得る。あるいは、コード配列は、制御配列および適切な制限部位をすでに含んでいる発現ベ

クター中に直接クローン化され得る。

#### 粒子状の核酸分子の調製：

一旦入手および/または構築されると、核酸分子は粒子状の形態で送達のために調製される。粒子状の生物薬剤（例えば、核酸）を調製するための1つの一般的な方法は、凍結乾燥（凍結-乾燥）である。凍結乾燥は、物質から水分を除去する技術に関し、そして非常に低い温度で急速に凍結させ、続いて高減圧での昇華によって急速に脱水することを含む。この技術は、代表的には、オープンマトリックス構造を有する低密度の多孔性の粒子を産生する。このような粒子は、化学的に安定であるが、水性環境に導入される場合、迅速に再構成される（崩壊し、そして/または溶液になる）。

これらおよび他の繊細なまたは感熱性の生体分子とともに使用され得る粒子性の核酸調製物を提供する別の方法は、スプレー乾燥である。スプレー乾燥は、ノズル、スピニングディスクまたは他の装置を用いる1以上の液体の溶液の微粒化、およびそれに続く液滴からの溶媒の蒸発に関する。より詳細には、スプレー乾燥は、高度に分散した液体調製物（例えば、溶液、スラリー、エマルジョンなど）と適切な容量の熱気とを組み合わせ、液体の液滴の蒸発および乾燥を生じる。スプレー乾燥製剤は、一般に、頻繁に凹窩した同種の球状粒子として特徴付けられる。このような粒子は低密度を有し、そして急速な速度の溶解度を示す。

凍結乾燥およびスプレー乾燥技術によって産生された低密度粒子固体は、シリンジまたはカテーテルを介する溶液での非経口投与についての再溶解に理想的である。しかし、このような粒子は、固体形態での針のないシリンジからの送達には有用でない。従って、本方法の目的のために、調製物は高密度化されて、針のないシリンジを用いる送達にはるかにより良好に適した核酸分子（例えば、約50

$\mu\text{m}$ のサイズおよび少なくとも約 $0.9\sim 1.5\text{g/cc}^3$ の密度を有する実質的に固体の粒子)を含む粒子を提供する。詳細には、スプレー乾燥または凍結乾燥によって提供される開放格子または凹窩殻の粒子は、加熱することなく凝縮されて、または剪断されて、針のない注射による送達に適切なサイズおよび密度の特徴を有する薬学粒子を産生するために製粉されるか、他の方法でサイズ減少され得る高密度

物質を提供し得る。

本発明の方法による送達のための核酸は、最初にスプレー乾燥または凍結乾燥に適切な処方物中に調製される。このような処方物は、一般に、核酸がその中で凍結および凍結乾燥に安定である溶液のみ、および必要に応じて、非経口的送達に受容可能な乾燥手順のための賦形剤を要求する。これに関して、適切な賦形剤は、個々の用量について十分な重量を提供する処方物に添加され得、これは、実際のプロセス（例えば、重量または容積）による用量の測定を可能にする。代表的な投薬量は、約 $0.5\sim$ 約 $5\text{mg}$ 、好ましくは、約 $1\sim$ 約 $2\text{mg}$ であり得る。適切な賦形剤は、炭水化物（例えば、トレハロース、グルコース、デキストロース、およびスクロース）、またはポリオール（例えば、マンニトール）を含むがこれらに限定されない。グリシンおよびその塩酸塩のようなアミノ酸は、とりわけ、リン酸、乳酸、またはクエン酸緩衝液と同様に緩衝液として使用され得る。さらに、DNA安定化のための公知の任意の組成物は、本処方物における使用を見出す。本組成物は、必要に応じて、添加剤（例えば、凍結保護物質、抗酸化剤など）を含み得る。本明細書中で提供される種々の粒子状核酸処方物の物理的および化学的安定性を増強するために組成物を調整することは、当該分野の技術範囲内である。

核酸処方物の再処理の間の安定化のための1つの特定のアプローチは、凍結乾燥のための凍結の前に溶液と合わせて核酸をコイル状または球状にさせ、従ってそうでなければ顕微鏡的に均質な粒子で不連続相として遺伝的物質を提供する添加物の使用を含む。このような処方物において、膨張剤は、乾燥固体において連続相であり、その結果、圧縮前の任意の粉碎、圧縮高密度化および再粉碎（以下

に詳細に記載されるように)、および篩または空気分類、加速化、注入を介するサイズ分けの間の任意の粒子摩擦によって、長鎖核酸が破壊されないようである。核酸内容物に関する粒子の均一性は、保存または注入の間のサイズによる分離の可能性のため、重要である。

スプレー乾燥粉末または凍結乾燥粉末の濃縮は、適切な圧縮機（例えば、水圧圧縮機、打錠圧縮機、または回転圧縮機）における圧縮により実施される。ここで、粉末は、約1,000~24,000ポンド/平方インチ（例えば、0.5~12トン/平方インチまたは7~170MPa）で適切な時間圧縮される。圧縮は、所望であれば、減

圧下で実施され得る。次いで、得られる圧縮材料は、視覚的に粉碎されるまで粗く再粉碎される。次いで、粒子サイズは、約20~50 $\mu$ mの平均サイズで個々の粒子密度が約0.9~1.5g/cm<sup>3</sup>にまで低減される。粒子サイズの低減は、ローラー製粉、ボール製粉、ハンマー製粉もしくは衝撃製粉、摩擦製粉、篩、超音波処理、またはそれらの組合せを含むがそれらに限定されない当該分野で周知の方法を用いて実施され得る。もちろんのこと、圧縮パラメーターおよび粒子サイズ分けは、使用される出発材料、所望の標的粒子サイズおよび密度などの考慮に依存して変化する。粒子密度は、ヘリウム比重などのような公知の定量技術を用いて容易に確認され得る。

従って、この方法は、約10~約250 $\mu$ mの範囲、好ましくは、約10~約150 $\mu$ m、および最も好ましくは約20~約60 $\mu$ mのサイズ；ならびに約0.1~約25g/cm<sup>3</sup>、好ましくは約0.8~約3.0g/cm<sup>3</sup>、および最も好ましくは約0.9~1.5g/cm<sup>3</sup>の粒子密度を有する核酸粒子を得るために使用され得る。

#### 核酸分子の投与：

処方 Continuing、粒子状核酸調製物は、針のないシリンジを用いて哺乳動物組織に送達される。本明細書中における使用のための1つの針のないシリンジは、一般に、本出願人に譲渡された国際公開番号WO 94/24263（1994年10月27日公開）において記載されている。シリンジは、ノズルを通じる通路を当初は封鎖し、そしてノズルの上流端部に実質的に隣接して配置されている破壊可能なメンブレン（単数または複数）を有する細長い管状ノズルを含む。送達される核酸粒子は、

破壊可能なメンブレンに隣接して配置され、そしてメンブレンの上流側に、メンブレンを破壊し、超音波気体流（薬学的粒子を含有する）を、その下流端部からの送達のためのノズルを介して産生するに十分な気体圧力を適用し、そして活性化手段を用いて送達される。従って、粒子は、マッハ1とマッハ8との間の送達速度（これは、破壊可能なメンブレンの爆発の際に容易に得られ得る）で針のないシリンジから送達され得る。

別の針のないシリンジの形状は、一般に、上記と同一のエレメントを含むが、超音速気体流内に含まれる薬学的粒子を有する代わりに、ノズルの下流端部が、

休止「反転」位置（ここで、ダイヤフラムは、核酸粒子を含むために下流面上に凸面を提示する）と活動「裏返し」位置（ここで、ダイヤフラムは、ダイヤフラムの上流面に適用されている超音速刺激波の結果として下流面上で外側にむけて凹型である）との間で移動可能である双安定なダイヤフラムとともに提供される。この様式で、ダイヤフラムの凸面内に含まれる粒子は、標的化皮膚または粘膜表面へのそれらの経皮送達のためのデバイスからの超音速の初期速度で駆逐される。

上記の針のないシリンジ形状を用いる経皮送達は、一般に $10\sim 250\mu\text{m}$ の間の範囲のおおよそのサイズを有する粒子とともに実施される最適な粒子サイズは、通常少なくとも約 $10\sim 15\mu\text{m}$ （代表的な細胞のサイズ）である。皮膚に有害な障害を生じる粒子のサイズである点である上限を伴うが、約 $250\mu\text{m}$ より大きい核酸粒子もまた、デバイスから送達され得る。送達される粒子が貫通する実際の距離は、粒子サイズ（例えば、およそ球面の粒子幾何を仮定する場合の名目上の粒子サイズ）、粒子密度、粒子が皮膚表面に影響する初期速度、ならびに皮膚の密度および運動力学的な粘度に依存する。これに関して、針のないシリンジ注入における使用のための最適な粒子密度は、一般に、約 $0.1$ と $25\text{g}/\text{cm}^3$ との間、好ましくは約 $0.9$ と $1.5\text{g}/\text{cm}^3$ との間の範囲であり、そして注入速度は、一般に約 $200\text{m}/\text{秒}$ と $3,000\text{m}/\text{秒}$ との間の範囲である。

針のないシリンジの特に独特の特徴は、送達される粒子の貫通の深さを密接に制御し、それによって種々の部位への核酸の標的化投与を可能にする能力である

。例えば、粒子の特徴および／またはデバイス操作パラメーターは、皮内送達について約1mm未満の貫通深度、または皮下送達について1～2mmを提供するように選択され得る。1つのアプローチは、(約2kg/秒/mと10kg/秒/mとの間、そしてより好ましくは約4kg/秒/mと7kg/秒/mとの間)運動量密度(例えば、粒子運動量を粒子表面積で割る)を提供する粒子サイズ、粒子密度、および初期速度の選択を含む。運動量密度のこのような制御は、粒子核酸の正確に制御された、組織選択的送達を可能にする。

治療的有效量の本明細書中に記載の粉末核酸分子を含む組成物は、上記の針のないシリンジを介して任意の適切な哺乳動物組織に送達され得る。例えば、この組成物は、筋肉、皮膚、脳、肺、肝臓、脾臓、骨髄、胸腺、心臓、リンパ、血液、

骨軟骨、膵臓、腎臓、胆嚢、胃、腸、精巣、卵巣、子宮、直腸、神経系、眼、腺、および結合組織に送達され得る。核酸分子は、好ましくは、最後まで分化した細胞に送達されそして発現される；しかし、この分子はまた、分化していないか、または部分的に分化した細胞(例えば、血液および皮膚線維芽細胞の幹細胞)へも送達され得る。

粉末組成物は、投薬処方物に適合可能な様式で、そして予防的および／または治療的に有効である量で処置される被験体に投与される。送達される組成物の量(一般に、1用量あたり $0.5\mu\text{g/kg}$ ～ $100\mu\text{g/kg}$ の核酸の範囲)は処置される被験体に依存する。正確な必要量は、処置される個人の年齢および全身状態、処置される状態の重篤さ、および選択された特定のヌクレオチド配列(単数または複数)、投与部位、ならびに他の因子に依存して変化する。適切な有効量は、当業者によって容易に決定され得る。

従って、本発明の粉末核酸分子組成物の「治療的有效量」は、疾患または状態症状の処置または予防をもたらすのに充分であり、そして日常の試験を通して決定され得る比較的広範囲内に落ち着く。

### C. 実験

以下は、本発明を実施するための特定の実施態様の実施例である。実施例は、

例示目的にのみ提供され、そしていかなる方法でも本発明の範囲を限定することを意図しない。

使用される数値（例えば、量、温度など）に関する正確度を確実にするための努力がなされたが、当然、いくつかの実験誤差および偏差が許容されるべきである。

### 実施例

以下の実験を、凍結乾燥DNAを遺伝物質の微粒子銃導入におけるDNAコート金属粒子に対する代替物として使用する可能性を調査するために実施した。詳細には、コントロールとして粉末化DNAプラスミドならびにDNAコートタングステン粒子をエクスピボで男性ヒト線維芽細胞HT1080細胞へ針のないシリンジ装置を使用して、

以下のように送達した。

クローン123は、一過性形質転換が色素生産性指標であるX-Galで測定され得るように $\beta$ ガラクトシダーゼマーカ遺伝子を含む約11kbの小プラスミドである。プラスミドを炭水化物賦形剤であるトレハロースで膨脹させた。トレハロースを、その安定化特性(Colacoら、(1992) Bio/Technology 10:1009)という理由で賦形剤として選択した。トレハロースを蒸留水に溶解させ、そしてDNAを溶液に添加する前に濾過滅菌した。3つの異なるDNA糖の溶液を、以下の表1に示す割合で作製した。

表1

調製物	1	2	3
クローン 123 (2.7 $\mu$ g/ $\mu$ L)	800 $\mu$ g (296.3 $\mu$ L)	160 $\mu$ g (59.3 $\mu$ L)	80 $\mu$ g (29.6 $\mu$ L)
トレハロース (100 mg/15 ml H <sub>2</sub> O)	10 mg (1.5 ml)	10 mg (1.5 ml)	10 mg (1.5 ml)
有効負荷 (8 $\mu$ g DNA に対して)	0.1 mg	0.5 mg	1.0 mg

次いで、このプラスミド/糖溶液を、(真空乾燥の前に溶液を凍結するために固体CO<sub>2</sub>およびイソプロパノールを用いて)凍結乾燥し、そして凍結乾燥されたDNA-トレハロース固体を粉砕して、めのう乳鉢および乳棒を用いて微粒子を形成した。

コントロールとして、DNAコートタングステン粒子を、微粒子をコーティングする公知の方法(Potterら、(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:7161, Kleinら、(1987) Nature 327:70、およびWilliamら、(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2726)の派生法を用いて、1.014  $\mu$ mの中央値(median)直径のタングステン微小発射体( $19.35 \times 10^3$  kb. $\mu$ m<sup>3</sup>)(M-17、GTE/Sylvania、Towanda、PA、USA)を、40マイクログラムのクローン123プラスミドDNAでコーティングすることによって作製し、8  $\mu$ g DNAの5つの有効負荷を与えた。

より詳細には、コーティングの前に、タングステン粒子を滅菌し、そして懸濁液にした。1.048  $\mu$ m(中央値直径)のタングステン微小発射体(M-17、GTE/Sylvania、Towanda、PA、USA)の50mgサンプルを、1.5ccのEppendorfチューブ中に秤量し、次いで100%エタノール(EtOH)中で滅菌した。微小発射体を分散する(粒子凝集体を破壊する)ために、滅菌された溶液を、Eppendorfチューブの外側をソニケーターのプロープと接触させることにより、完全に超音波処理した。分散させたタングステン粒子を遠心分離し、そして上清を取り除いた。タングステン粒子を、1 ccの滅菌蒸留水中に再懸濁し、そして2サイクルで遠心分離し、次いでコーティングするまで1 ccの滅菌蒸留水中に貯蔵した。

プラスミドDNAを、上記で調製されたタングステン粒子の懸濁液40  $\mu$ Lに、20  $\mu$ LのDNA(1 mg/mL)を添加することにより、タングステン微小発射体に吸収させた。懸濁液を、ボルテックスして試薬の適切な攪拌を確実にした。次いで、以下の試薬を、所定の順で各添加後にボルテックスして添加した：253  $\mu$ L CaCl<sub>2</sub>(2.5M)；50  $\mu$ L スペルミジン(0.10M、凍結貯蔵)；および207  $\mu$ Lの滅菌蒸留H<sub>2</sub>O。最終混合物を4℃で10分間ボルテックスした。次いでこのDNAコートタングステン微小発射体を500Gで5分間遠心分離した。遠心分離後、すべての上清を注意深く取り除き、そして100  $\mu$ Lの70% EtOHを添加した。このコーティングされた粒子を再度遠心分離し、すべての上清を取り除き、そして最終調製物を、30  $\mu$ Lの10



0% EtOH中に再懸濁した。

上記の方法は、針のないシリンジによる4～5の送達を可能にする適切な量のDNAコートタングステン粒子を生じた。上記の試薬の量は、勿論、公知の方法に従って、DNAの異なる装填を提供するために変化させ得る。タングステンをDNAでコーティングするために用いられるストック溶液の容量およびモル濃度(M)を以下の表2に示す。

表 2

成分	量 (μL)
タングステン 粒子 (50 mg/mL)	40
クローム 123 (2.7 μg/μL)	14.8
Ca Cl <sub>2</sub> (2.5 M)	253
スperlミジン (0.1 M)	50
蒸留 H <sub>2</sub> O	212.2

形質転換には、6 cm直径の培養皿に、 $5 \times 10^5$  のヒト男性の線維芽細胞HT1080細胞を、トランスフェクションの24時間前に播種した。2つの複製された皿を、処置の各々について調製し、そして2つのネガティブコントロールプレートもまた調製した。

次いで、微小粒子およびタングステンコート粒子を、上記のように、針のないシリンジを用いて細胞に送達した。このシリンジは、プランジャー型バルブを有する4.5mLのリザーバーチャンバー、ヘリウムガスリザーバー、マッハ(Mach)2ノズル、および6 mm直径のダイヤフラムにハンドパンチした12 μmのマイラー(Mylar)シートを含んでいた。

特に、マイラーダイヤフラムは、最初、単独で濾紙小片の間に挿入し、他の上に1つを積み重ね、アルミニウム箔で覆い、そしてオートクレープテープで完全にシールして、オートクレーププロセスの間に濾紙/ダイヤフラムスタックに水が進入しないことを確実にすることにより滅菌した。これは、アルミニウム箔で

覆われたビーカーの内側に配置され、そしてオートクレーブチャンバー内に配置された。

2つの6mm直径の12 $\mu$ mマイラーダイヤフラムを、膜カセットの中で用いた。1ミリグラムおよび1/2ミリグラムの有効負荷の凍結乾燥DNA粉末を、カセット内の下部膜の上に装填した。次いで、この有効負荷を、カセットの他の小片および残りのダイヤフラムで覆った。実験では、調製物2および3のみを用いた。なぜ

なら、小重量を正確に秤量することが困難であったからである。別の5つのカセットは、5 $\mu$ LのDNA/タングステン粒子懸濁液で各々装填した。上記の量のすべては、用いた粒子処方物にかかわらず、各発射で送達される約8 $\mu$ gのDNA重量を与えた。

ここで図1を参照して、送達装置2は、上記のようなカセットを装填した針のないシリンジ4を含んで組み立てられた。針のないシリンジ4は、標準的チューブクランプ8を用いてリングスタンド6上に配置され、シリンジを、HT1080細胞12を播種した培養皿10に対して適所に保持した。針のないシリンジ4の下流末端14と培養皿10中の細胞12との間の距離を、一般的にdで示される標的距離を固定するために測定した。凍結乾燥DNAの送達のためのパラメーターを最適化するために、標的距離dを一定の送達圧力を超えて変化させたか、または送達圧力を一定の標的距離で変化させた。特に、DNA調製物は、30～50バールの範囲のヘリウム駆動ガス圧力を用いて20～60mmの範囲の標的距離から発射した。

形質転換の後、細胞を2日間インキュベートし、染色し、次いで先に記載の方法を用いてX-galで一時的アッセイを実施して形質転換効率を決定した。Murray, E.J.(編)(1991)Methods in Molecular Biology:Gene Transfer and Expression Protocols、第7巻、Humana Press、Clifton、New Jersey。詳細には、形質転換効率は、青に染色された細胞の数を計数することにより評価した。送達パラメーターおよび形質転換結果を以下の表3に示す。発破(blast)の影響は、極めて小さい1ポイント(約5～8mmである死細胞ゾーンの直径)から非常に大きい5ポイント(30mmより大きい細胞ゾーンの直径)で評価した。観察され得るように、本発明のプラスミド/トレハロース粉末調製物による形質転換は、金属粒子につい

て観察された形質転換と同じオーダーであった。

図2に示されるように、粒子状プラスミド/トレハロース調製物で、最適な形質転換結果は、60mmの標的距離で30バールの圧力を用いて送達されたとき観察された。より特異的には、図2は、DNAコートタングステン粒子の従来の送達および現在の送達を用いて、粒子状核酸調製物(調製物2および3の両方)の送達により得られた形質転換効率の直接的な比較を提供する。ここで図3を参照して、30バールでの送達に対して得られたデータを、標的距離の関数として形質転換効率

を示すグラフで示す。観察され得るように、第2および第3調製物(それぞれF#2およびF#3と称される)に対する最適標的距離は到達しなかった；しかし、形質転換効率は、標的距離が増加するにつれて実質的に増加した。さらに、送達が、試験された最大距離(60mm)で実施された場合、粒子状DNA処方物(F#2およびF#3)で得られた形質転換効率は、DNAコートタングステンコントロールで観察された形質転換効率より感知される程度に良好であった。

図2および図3では、以下の略号(これは上記では定義されていない)が適用される：

B/P プレートあたりの青色細胞数

TCC タングステン現在のコントロール

THC タングステン従来のコントロール

さらに、図3では、プロットされた点は以下の通りである：

● F#2

■ F#3

▲ タングステン(d=20で、点は不明)

## 実施例2

以下の研究は、本発明の方法を用いて、粉末化核酸組成物を、インビボで試験被験体に送達する能力を評価するために実施した。

プラスミドベクター構築物：CMVプロモーターの制御下にあるGreen Fluorescent Protein(GFP)遺伝子を含むpGREEN-1ベクター構築物を、遺伝子発現が、処置された組織サンプルからの組織学的切片のUV顕微鏡観察により直接評価され得るよ

うに用いた。

粉末化核酸組成物：粉末化核酸組成物を以下のように調製した。pGREEN-1ベクタープラスミドをトレハロース糖と組み合わせることにより混合物を形成し、 $1\mu\text{g} : 1\text{mg}(\text{w/w})$  DNA-糖組成物を得た。この組成物を、本明細書中上記に記載した技術を用いて、凍結乾燥し、圧縮し、粉碎し、次いでふるいにかけた。得られた濃縮された核酸組成物は、約 $38\sim 75\mu\text{m}$ の範囲の平均粒子サイズを有していた。

投与：C57BL/10マウスを、 $1\text{mg}$ の粒子状組成物を用い、針を用いない注入を経

由して処置した。組成物を、適切に準備した標的皮膚表面に送達し、そして投与の24時間後に、標的部位<sup>24</sup>から組織学的切片を得た。GFP発現は、UV顕微鏡観察を用いて直接測定した。投与の結果、GFP発現が処置された皮膚組織で観察され、標的皮膚への粉末化核酸組成物の成功したインビボ送達、および引き続き宿主細胞のトランスフェクションおよびそれからのGFP遺伝子の発現を確認した。

別の研究では、ヒト生長ホルモン(hGH)または $\beta$ -ガラクトシダーゼ( $\beta$ -Gal)のいずれかの発現カセットを含むプラスミドを、トレハロース賦形剤とともに凍結乾燥し、核酸処方物を形成し、それを、上記に記載した技術を用いて、圧縮し、粉碎し、次いでふるいにかけた。得られる濃縮された核酸組成物は、約 $38\sim 75\mu\text{m}$ の範囲の平均粒子サイズを有していた。

雌ブタ(体重 $20\sim 25\text{kg}$ )をハロタンで麻酔し、そして腹の皮膚をつまみ、適切な標的部位を示した。上記の粉末化核酸組成物を、準備された標的部位に、 $0.1\mu\text{g}$  (hGH)または $1\mu\text{g}$  ( $\beta$ -Gal)用量で、針のない注入デバイスを介して別々に投与した(60バールの送達圧力)。処置の24時間後、標的部位を組織診し、そして組織学的切片を、ヒト生長ホルモンまたは $\beta$ -Gal発現について分析した。処置された部位で、hGH現は、アッセイの検出限界内では観察されなかったが、中程度の $\beta$ -Gal発現が観察された。この研究における検出可能なhGH発現の欠如は、おそらく、組成物中の核酸の低い装填密度( $0.1\mu\text{g}$ )に起因する。

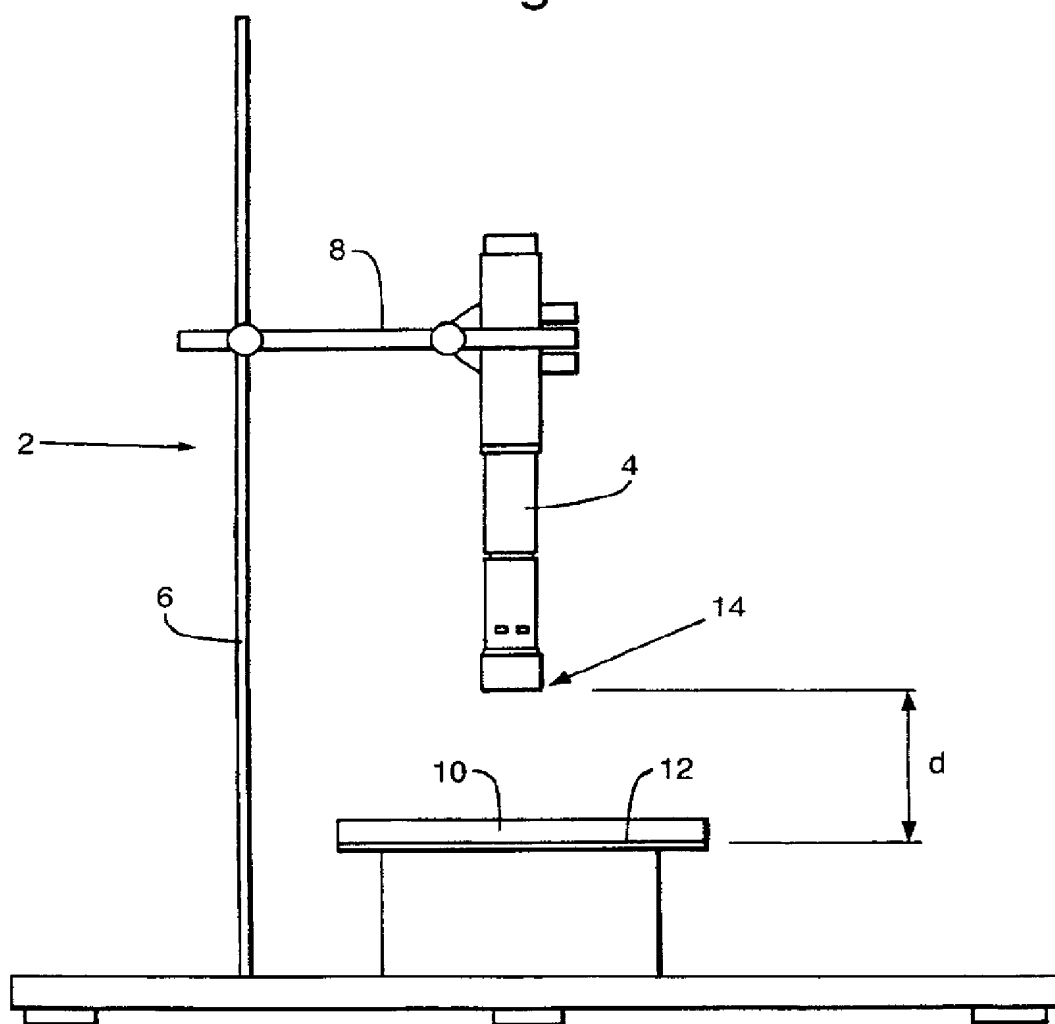
従って、DNA送達のための新規な方法が開示された。本発明の好ましい実施態様を詳細に記載したが、添付の請求項により規定されるような本発明の精神および範囲から逸脱することなく自明な改変がなされ得ることが理解される。

表3

発射	処方物	標的距離	圧力	青色細胞数	発破効果
A 1	タングステン	60	30	224	2
A 2	タングステン	60	30	596	2
A 3	タングステン	60	30	575	2
A 4	タングステン	60	30	581	2
A 5	タングステン	60	30	-	-
B 1	#3 トレハロース	20	30	155	3
B 2	#3 トレハロース	20	30	227	3
C 1	#3 トレハロース	40	30	654	2
C 2	#3 トレハロース	40	30	643	2
D 1	#3 トレハロース	40	50	394	4
D 2	#3 トレハロース	40	50	175	5
E 1	#3 トレハロース	60	30	1416	1
E 2	#3 トレハロース	60	30	1654	1
F 1	#3 トレハロース	60	50	408	3
F 2	#3 トレハロース	60	50	486	3
G 1	#2 トレハロース	20	30	166	3
G 2	#2 トレハロース	20	30	180	3
H 1	#2 トレハロース	20	50	129	4
H 2	#2 トレハロース	20	50	53	4
J 1	#2 トレハロース	40	30	347	2
J 2	#2 トレハロース	40	30	546	2
K 1	#2 トレハロース	40	50	377	4
K 2	#2 トレハロース	40	50	198	4
L 1	#2 トレハロース	60	30	1451	1
L 2	#2 トレハロース	60	30	1164	1
M 1	#2 トレハロース	60	50	409	3
M 2	#2 トレハロース	60	50	336	3

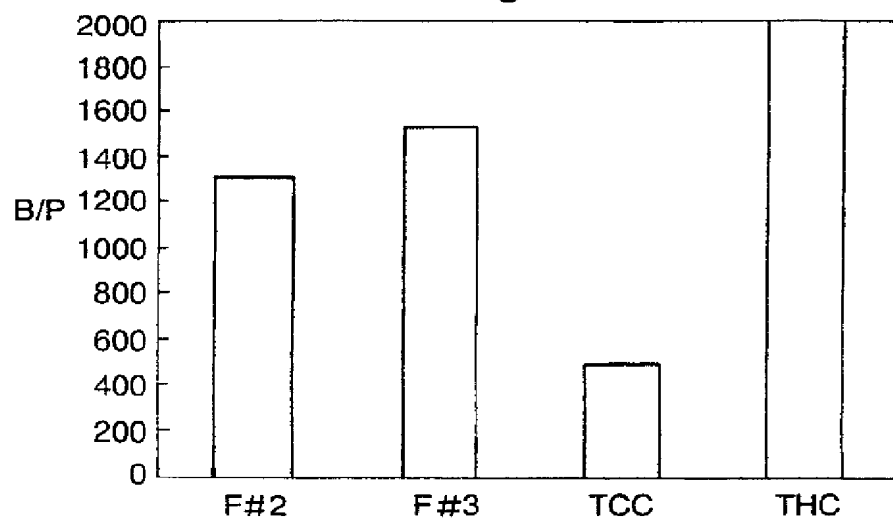
【図1】

Fig.1.



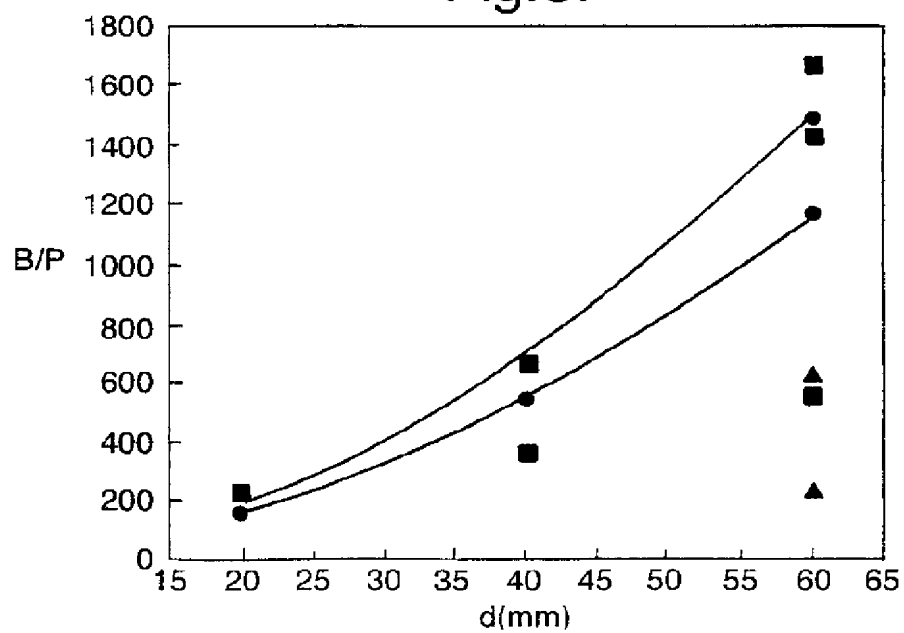
【図2】

Fig.2.



【図3】

Fig.3.



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/GB 97/02478

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 6 A61K9/16 A61K9/14 A61K48/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 94 23738 A (MEDISORB TECHNOLOGIES INTERNATIONAL L.P.) 27 October 1994 see page 4, line 9 - page 7, line 12 see page 27, line 6 - line 25 see claims 1,4 ---	1-5,7-25
E	WO 97 48485 A (POWDERJAECT RESEARCH LIMITED) 24 December 1997 see page 4, line 7 - page 4, line 17 see page 9, line 1 - line 5 see page 9, line 25 - line 29 -----	1-25
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
28 April 1998		13.05.98
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL- 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 eponl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Benz, K



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/GB 97/02478

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 21, 13-20, 24 (part.)  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claims 21 and 13-20, 24 (partially) are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

Int. .ional Application No

PCT/GB 97/02478

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9423738 A	27-10-94	AU 6707194 A	08-11-94
		CA 2160878 A	27-10-94
		EP 0696200 A	14-02-96
		JP 8510639 T	12-11-96
		NZ 265818 A	22-09-97
<hr/>			
WO 9748485 A	24-12-97	AU 3102597 A	07-01-98
<hr/>			

---

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, EE, GB, GH, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW

(72)発明者 ポーター, リンダ マリー  
オーストラリア国 キューエルディー  
4061, ザ ギャップ, ホリス ストリート  
6

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載  
【部門区分】第3部門第2区分  
【発行日】平成17年5月12日(2005.5.12)

【公表番号】特表2001-500858(P2001-500858A)

【公表日】平成13年1月23日(2001.1.23)

【出願番号】特願平10-513388

【国際特許分類第7版】

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 31/7088

A 6 1 K 47/36

【F I】

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 31/7088

A 6 1 K 47/36

【手続補正書】

【提出日】平成16年9月10日(2004.9.10)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】補正の内容のとおり

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 手続補正書



平成16年9月10日

特許庁長官 殿

## 1. 事件の表示

平成10年特許願第513388号

## 2. 補正をする者

住所 イギリス国 オーエックス4 4ジーエイ オックスフォード,  
ジ オックスフォード サイエンス パーク,  
ロバート ロビンソン アベニュー 4  
名称 パウダージェクト リサーチ リミテッド

## 3. 代理人

住所 〒540-6015 大阪府大阪市中央区城見一丁目2番27号  
クリスタルタワー15階  
氏名 (7828) 弁理士 山本 秀策  
電話(大阪) 06-6949-3910



## 4. 補正対象書類名

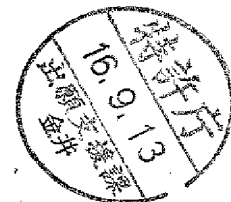
請求の範囲

## 5. 補正対象項目名

請求の範囲

## 6. 補正の内容

請求の範囲を別紙のとおり補正します。



### 請求の範囲

1. 治療に用いるための、核酸分子を含み、金属キャリアを含まない、粒子。
2. 治療に用いるための、核酸分子からなる、またはその重量が核酸分子を主に含む、粒子。
3. 平均サイズが、皮膚または粘膜組織中の標的細胞のサイズと少なくとも同じ大きさである、請求項1または2に記載の粒子。
4. 平均サイズが10～250  $\mu\text{m}$ である、請求項1～3のいずれかに記載の粒子。
5. キャリアを含む、請求項1～4のいずれかに記載の粒子。
6. 前記キャリアがトレハロースを含む、請求項5に記載の粒子。
7. 前記核酸分子が、免疫原をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項1～6のいずれかに記載の粒子。
8. 皮膚または粘膜組織への針を用いない投与による治療に用いるための、金属キャリアを含まない医薬の製造のための、核酸分子を含む粒子の使用。
9. 前記粒子が、請求項2～7のいずれかに規定される、請求項8に記載の使用。
10. 前記核酸分子が、標的細胞ゲノムから欠損または欠失しているタンパク質をコードする遺伝子を含む、請求項8または9に記載の使用。
11. 送達されるべき活性成分として、請求項1～7のいずれかで規定される粒子を含む、針のないシリンジ。
12. 2～10 kg/秒/mの間の運動量密度で粒子を送達するように適合された、請求項11に記載の針のないシリンジ。
13. 皮膚または粘膜組織中の標的細胞に、核酸分子を含む粒子を送達するための組成物であって、該組成物が、核酸分子を含む粒子を含み、該粒子が、針のないシリンジによって該皮膚または粘膜組織に投与され、かつ金属キャリアを含まない、組成物。
14. 前記粒子が、前記標的細胞のサイズと等しいか、またはそれより大きい平均サイズを有する、請求項13に記載の組成物。
15. 前記粒子が、主に約10～250  $\mu\text{m}$ の範囲にある平均サイズを有する、請求項13に記載の組成物。

16. 前記組成物が、2～10 kg/秒/mの間の運動量密度で、前記皮膚または粘膜組織粒子に投与される、請求項13～15のいずれかに記載の組成物。
17. 前記組成物が、表皮組織中の標的細胞に送達される、請求項13～16のいずれかに記載の組成物。
18. 前記組成物が、皮膚組織の基底層中の標的細胞に送達される、請求項13～16のいずれかに記載の組成物。
19. 前記粒子が、核酸分子およびキャリア材料を含む、請求項13～18に記載の組成物。
20. 前記キャリア材料がトレハロースを含む、請求項19に記載の組成物。
21. 前記組成物が、インビボで前記皮膚または粘膜組織に送達される、請求項13～20のいずれかに記載の組成物。
22. 前記組成物が、エキスビボで前記皮膚または粘膜組織に送達される、請求項13～20のいずれかに記載の組成物。
23. 前記核酸分子が、前記標的細胞ゲノムから欠損または欠失しているタンパク質をコードする遺伝子を含む、請求項13～22のいずれかに記載の組成物。
24. 前記核酸分子が、免疫原をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項13～22のいずれか1項に記載の組成物。
25. 針のないシリンジによる皮膚または粘膜組織への投与に適切な粒子状核酸組成物であって、該組成物は金属キャリアを含まない、組成物。